

家蚕 CyPA 基因的克隆、表达谱及进化分析

李春峰¹, 刘文明¹, 黄科¹, 范晓东¹, 周泽扬^{1,2,*}

(1. 西南大学蚕学与系统生物学研究所, 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716; 2. 重庆师范大学, 重庆 400047)

摘要: CyP 蛋白家族在蛋白质折叠过程中起着重要作用。本研究克隆了家蚕 *Bombyx mori* CyPA 基因(*BmCyPA*), 该基因由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 推导开放阅读框编码 165 个氨基酸, 分子量为 19.4 kD, 等电点为 8.79。序列分析表明 *BmCyPA* 在不同物种间具有高度的保守性, 含有肽酰脯氨酸顺反异构酶活性位点及与 CsA 侧链结合的氨基酸, 提示 *BmCyPA* 可能具有肽酰脯氨酸顺反异构酶活性和与 CsA 结合的特性。组织表达谱及 EST 数据分析显示, *BmCyPA* 在丝腺中高丰度表达。通过对不同物种来源的 CyP 基因的进化分析, 进一步预测了 *BmCyP* 基因的功能, *BmCyP* 可能与丝蛋白的正确折叠相关。

关键词: 家蚕; CyP 基因; 丝腺; 基因克隆; 系统进化; 表达谱

中图分类号: S881.2.078 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)04-0349-08

Cloning, expression pattern and phylogenetic analysis of cyclophilin A gene in the silkworm, *Bombyx mori*

LI Chun-Feng¹, LIU Wen-Ming¹, HUANG Ke¹, FAN Xiao-Dong¹, ZHOU Ze-Yang^{1,2,*} (1. Institute of Sericulture and Systems Biology, Key Sericulture Laboratory of Agriculture Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: CyP protein family plays an important role in the process of protein folding. In this study, a novel silkworm gene *BmCyPA* was cloned, which comprises 2 exons and 1 intron. The deduced *BmCyPA* protein contains 165 amino acids, its molecular mass is 19.4 kD and pI is 8.79. Sequences analysis showed that *BmCyPA* is highly conserved among different species. The *BmCyPA* protein has peptidylprolyl *cis-trans*-isomerase active sites and contains specific amino acids which can bind to the side chain of CsA, which indicated that *BmCyPA* has potential *cis-trans*-isomerase activity and can combine with CsA. RT-PCR of tissue expression pattern and EST analysis revealed that *BmCyPA* is specifically and highly expressed in silk gland. The potential function of *BmCyPA* gene was further analyzed by phylogenetic analysis of CyPA genes from different species. The results suggest that *BmCyP* may be involved in the process of fibroin folding.

Key words: *Bombyx mori*; CyP gene; silk gland; gene cloning; phylogeny; expression pattern

Handschumacher 等(1984)从哺乳动物胸腺细胞中发现了一个 18 kD 的蛋白, 这种蛋白是免疫抑制剂环孢菌素 A(cyclosporin A, CsA)的胞内受体, 被命名为 cyclophilin(CyP)。CsA 在人类器官移植中, 是预防移植排斥反应的重要药物。CsA 与 CyP 结合形成 CsA-CyP 复合体, 发挥免疫抑制作用(Barik, 2006)。

CyPs 在进化过程中高度保守, 在多种生物体中均有其表达, 包括芽孢杆菌、大肠杆菌、酵母菌及高等真核生物; 而且 CyP 家族成员众多, 在胞内广泛

分布且表达丰富, 在哺乳动物细胞的胞质、线粒体、核和内质网中及大肠杆菌的细胞质中均有发现。迄今为止, 已发现的人类 CyP 至少有 15 种, 分子量从 8 kD 到 15 kD 不等。按 CyP 在细胞中的分布及氨基酸序列等特征, CyP 家族可分为 CyPA, CyPB, CyPC, CyPD, CyP40 和 CyP160 等(Wang and Heitman, 2005)。其中 CyPA 位于细胞浆, 是 CsA 的主要受体。

CyP 蛋白家族具有肽酰脯氨酸顺反异构酶(peptidylprolyl *cis-trans* isomerase, PPI)活性, 可催化

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目(2004AA2Z1020); 国家自然科学基金项目(30400328); 科技部“863”项目(2006AA10A117)

作者简介: 李春峰, 男, 1971 年 11 月生, 甘肃张掖人, 博士研究生, 研究方向为分子生物学, E-mail: cflil@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zyzhou@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-09-23; 接受日期 Accepted: 2008-02-19

脯氨酰多肽和脯氨酰蛋白的顺反结构互变(Wang and Heitman, 2005; Barik, 2006)。CsA 与 CyP 的结合可抑制其 PPI 活性。此外, CyP 还起到分子伴侣的作用(Gething and Sambrook, 1992), 如在 HepG2 细胞中加入 CsA 会延迟转铁蛋白的折叠(Lodish and Kong, 1991)。自从发现脯氨酸异构酶是免疫抑制剂 CsA 的结合受体后, 对这类变构酶的研究引起了很大的关注。除了免疫抑制作用外, 脯氨酸异构酶还在信号传递、蛋白变构和组装、细胞凋亡、基因的转录和翻译, 以及细胞有丝分裂等方面发挥重要作用(Zheng *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2003; Boulos *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2007)。

家蚕 *Bombyx mori* 丝腺是合成丝蛋白的特殊器官, 具有强大的合成和分泌丝蛋白的能力。家蚕丝腺与其他组织和器官相比, 拥有更多的酶调节基因、分子伴侣和结构蛋白基因, 这与丝腺主要行使蛋白质的合成和加工功能一致。丝腺的蛋白质合成和分泌调控的分子机理是近年的研究热点, 阐明丝腺组织重要基因的功能, 无论对于基础理论研究还是应用研究都具有重要的理论和实际意义。本研究克隆了家蚕 *CyPA* 基因, 并对不同组织中 *BmCyPA* 基因的表达情况进行了研究。通过对不同物种来源的 CyP 基因的进化分析, 预测了 *BmCyP* 基因的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕大造品种由西南大学家蚕基因库保存, 饲养至 5 龄第 3 天, 解剖获得丝腺、头部、表皮、脂肪体、中肠、精巢等材料。

1.2 方法

1.2.1 家蚕总 RNA 的提取和 cDNA 模板的制备: 家蚕丝腺、头部、表皮、脂肪体、中肠、卵巢、精巢各组织总 RNA 的提取方法参照 Tripure Isolation Reagent (Roche) 试剂提供方法。参照 Promega 公司提供方法, 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物, 用 M-MLV (Promega) 将所提取的 mRNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 家蚕 *CyPA* 基因的克隆: 自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载所有家蚕的 EST 序列, 共 138 289 条组建成本地的 EST 库。家蚕基因组序列为本实验室与中国科学院北京基因组研究所采用鸟枪法共同测定(Xia *et al.*, 2004)。以果蝇 *Drosophila melanogaster* *CyPA* (GenBank accession no.: P25007) 的氨基酸序列为质询序列, 用 tblastn 程序检

索家蚕 EST 库, 得到一条同源性高的 EST 序列; 再以这条 EST 序列为质询序列, 用 blastn 程序检索家蚕 EST 库, 将检索到的 EST 序列用 DNASTAR 进行电子延伸。重复检索、延伸步骤直到不能延伸为止, 得到家蚕 *CyPA* 基因重叠群(contig)。

根据电子延伸结果设计家蚕 *CyPA* 引物: F, 5'-CGGCAAAATGTCTCTACCAC-3'; R, 5'-TAAATTAGGCAATCTGACCACA-3'。以 5 龄 3 天的丝腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色检测后, 将 DNA 片段回收、克隆到 pMD18-T 载体并测序。

1.2.3 家蚕 *CyPA* 基因 3'RACE 扩增、克隆及测序: 利用反转录引物 oligo(dT): 5'-ATATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGd(T)₈-3', 将丝腺总 RNA 1 μg 反转录为 cDNA 模板, 应用上游引物 5'-CGGCAAAATGTCTCTACCAC-3' 和下游特异引物 5'-ATATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGTTTT-3' 进行 3'RACE 扩增。扩增条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 62℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色检测后, 将 DNA 片段回收、克隆到 pMD18-T 载体并测序。

1.2.4 *BmCyPA* 基因的组织表达谱分析: 5 龄第 3 天家蚕各组织总 RNA 用 Tripure 抽提。20 μL 反转录体系中, 含 1 μg 总 RNA, 200 U M-MLV 反转录酶。PCR 反应体系为 25 μL: 上下游引物各 0.4 μmol/L; dNTPs 0.2 mmol/L; cDNA 模板 1 μL; MgCl₂ 1.5 mmol/L; 10× PCR reaction buffer 2.5 μL; Taq 1 U。反应条件如下: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 2 min, 28 个循环; 72℃ 10 min。*CyPA* 引物为 F 和 R 引物组合, 内参为家蚕 *actin3* 基因。5 μL PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后, 用 Gel Doc 2000 凝胶图像仪(BIO-RAD, USA) 检测分析。

1.2.5 基因进化分析: 从 GenBank 数据库下载不同物种的 *Cyp* 基因的氨基酸序列, 用 CLUSTAL X 软件进行同源性比对, 用 PHYLIP 软件(version 3.5) 进行进化分析, 用 PHYLIP 软件 DNADIST 程序计算 Kimura's 距离(Kimura's distances), 用 PHYLIP 软件 NEIGHBOR 程序作出邻位相接进化树(neighbor-joining tree)。

2 结果与分析

2.1 家蚕 *BmCyPA* 基因的克隆

电子延伸得到的家蚕 *CyPA* 基因重叠群长度为 510 bp,设计引物后,以 5 龄 3 天家蚕丝腺 cDNA 为模板,扩增得到一条约 500 bp 的条带。将该片段连接到 pMD18-T 载体,经 PCR 扩增后亦得到一条长度约 500 bp 的片段(图 1:A),测序结果与预测的基因序列一致。

对家蚕 *CyPA* 3'RACE 的扩增得到 1 条约 900 bp 左右的条带(图 1:B)。将该片段回收连接到 pMD18-T 载体,用 *Sal* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定,得到一条长度约 900 bp 的片段(图 1:C)。将阳性克隆进行测序。

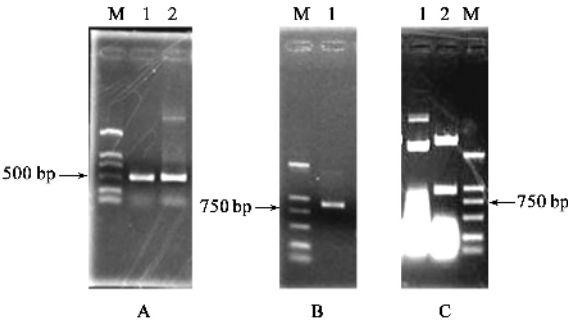


图 1 家蚕 *CyPA* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *CyPA* gene of *Bombyx mori*

A. 家蚕 *CyPA* 基因 RT-PCR 扩增及重组质粒鉴定 RT-PCR assay of silkworm *CyPA* gene and identification of recombinant plasmid. M: 分子量标准 λ -EcoT14 I Digest Marker; 1: RT-PCR 产物 RT-PCR product; 2: 重组质粒 PCR 产物 PCR product of recombinant plasmid. B. 家蚕 *CyPA* 基因 3'RACE 扩增 3'RACE assay of silkworm *CyPA* gene. M: DL2000 分子量标准 DL2000 Marker; 1: 3'RACE 产物 3'RACE product; C. 重组质粒的酶切 Digestion of recombinant vector. 1: 重组质粒 Recombinant vector; 2: 酶切产物 Recombinant vector digested with *Sal* I and *Bam*H I; M: DL2000 分子量标准 DL2000 Marker.

2.2 *BmCyPA* 基因的核苷酸序列分析

BmCyPA 基因经 RT-PCR 得到一段长为 510 bp 的 cDNA 片段,开放阅读框长度为 498 bp,3'RACE 扩增得到一段包含 *CyPA* 基因阅读框序列的长度为 872 bp 的 cDNA 片段,包含 ploy(A)尾(图 2)。该开放阅读框编码的蛋白质由 165 个氨基酸组成,分子量为 19.4 kD,等电点为 8.79(用蛋白分析软件 EXPASY, <http://www.expasy.ch/> 预测分析)。我们已将该序列登录到 GenBank (GenBank 登录号: DQ201183)。应用 Sim4 程序(http://gamay.univ-perp.fr/analyse_seq/sim4),将 *CyPA* 基因的编码区序列与家蚕基因组 contig 序列比对,结果显示 *CyPA* 基因具有 2 个外显子和 1 个内含子。用蛋白质分析软件 EXPASY(<http://www.expasy.ch/>)预测分析演绎蛋白质特性及可能的二级结构,其中 α -螺旋

(Alphahelix) 18.79%,延伸主链(extended strand) 26.67%,随机卷曲(random coil) 46.67%。

将克隆得到的 *BmCyPA* 基因序列在 NCBI 里进行同源性检索,得到了从细菌到人类的同源性基因。选取了人、鼠、玉米、果蝇、酵母、细菌等 6 个物种的 *CyPA* 基因与家蚕 *CyPA* 基因进行序列比对分析(图 3)。从比对结果可以看出家蚕 *BmCyPA* 基因与这些物种的同源性都较高,家蚕 *BmCyPA* 基因与人及鼠的一致性达 70%~84%,与酵母和玉米的一致性达 68%~71%;与细菌的一致性达 50%~60%;家蚕 *BmCyPA* 基因中部核心区域与其他真核生物物种的同源性高达 75% 以上。这些高度保守的区域与 CsA 的结合及 PPI 的催化活性相关。

2.3 *BmCyPA* 基因的组织表达谱分析

对家蚕丝腺、头部、表皮、脂肪体、中肠、卵巢、精巢各组织 *BmCyPA* 基因 mRNA 转录水平进行检测,以家蚕 *actin3* 为对照,结果表明:家蚕 *CyPA* 基因在丝腺和生殖腺中表达量比较高,在头部、表皮、中肠、脂肪体中也均有表达(图 4:A)。将 *CyPA* 基因的编码序列通过 blastn 程序检索家蚕 EST 库,除头部和表皮目前没有 EST 库,丝腺检索得到的 EST 数最多,有 92 条,与 RT-PCR 结果一致,在其余各组织 EST 库中都检索到不同数目的 EST(图 4:B)。

2.4 *BmCyP* 基因家族分析

以克隆得到的序列为种子序列,应用 blastn 程序至家蚕基因组数据库 SilkDB 里进行同源性检索,共检索得到 16 条同源基因,加上 NCBI 上公布的两个数据(DQ311261 和 DQ311248),共 18 个家蚕 *CyP* 基因组成家蚕 *CyP* 基因家族(表 1)。家蚕 *CyP* 基因家族可分为两类,一类是只含 *CyP* 保守结构域的单结构域(single domain,SD)基因,另一类为多结构域(multidomain,MD)基因,除含有 *CyP* 保守结构域外,还具有其他的保守结构域(图 5)。

图 6 为家蚕 *CyP* 家族(包括单一结构域及多结构域)蛋白质序列比对分析结果,有的蛋白质只选取了具有功能域的部分序列,表 1 中详细列出了用于分析的序列长度范围。家蚕 *CyP* 家族序列二级结构的预测以人 *CyPA* 作为参照。具有 SD 序列的家蚕 *CyP* 与人 *CyPA* 具有较高的一致性,最低的 DQ311261 与人 *CyPA* 的一致性也达到了 39%。应用 PredictNLS 程序预测这 14 个含 SD 序列基因的亚细胞定位,发现它们分别表达在细胞质、胞核和线粒体中。

另外,有 4 个家蚕 *CyP* 基因编码了具有多个功

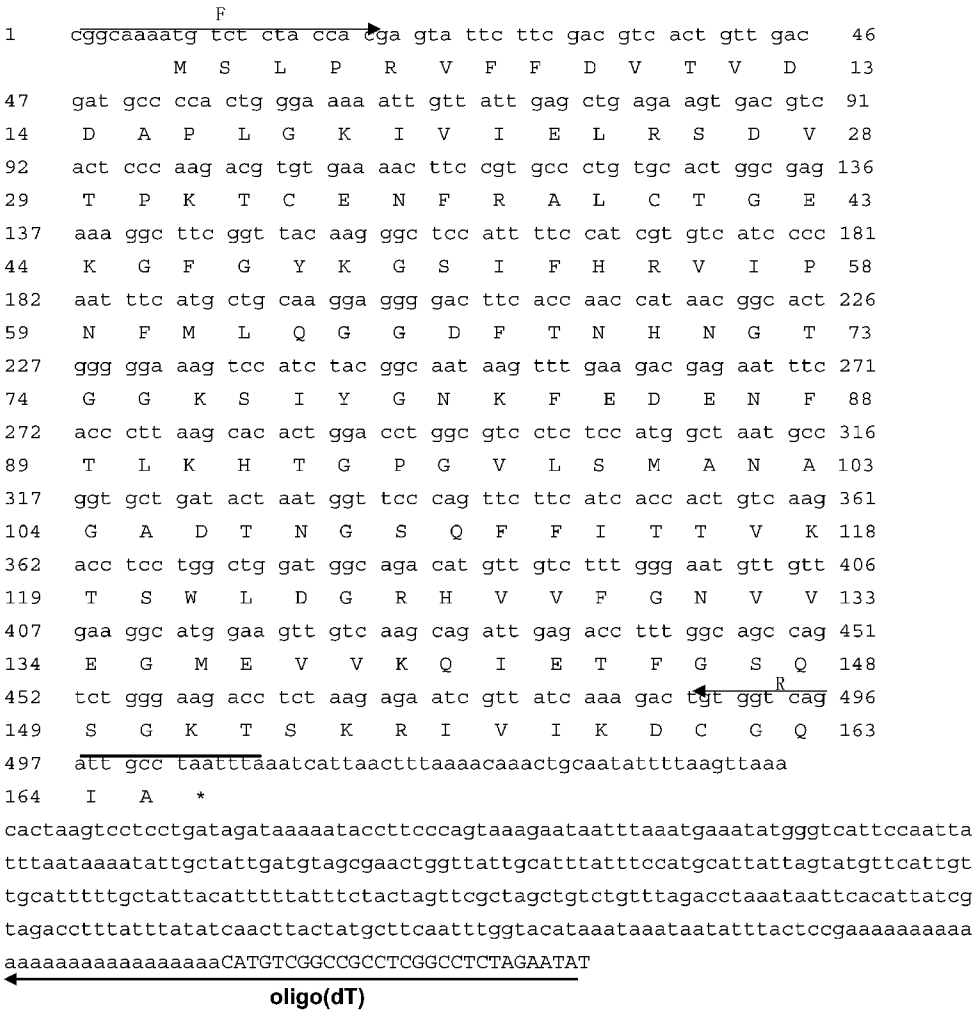


图2 家蚕 *CyPA* 基因的核酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleic acid sequence and deduced protein sequence of *CyPA* gene of *Bombyx mori*
F: 上游引物 Forward primer; R: 下游引物 Reverse primer.

能域的 CyP 蛋白质(MD CyPs)。其中 Bmb013088 和 Bmb014624 均具有与 RNA 相互作用的结构——RNA 识别基序(RRM),提示 CyP 可能在 RNA 加工的调控中起作用。Bmb022911 的氮端具有一段长约 43 个氨基酸的高度保守的 RING-finger 区域,以及一段长约 45 个氨基酸的 B-box zinc finger 区域。Bmb022610 的 N 端具有 3 段跨膜域(TMD)。

2.5 家蚕 CyP 基因家族系统发生分析

人 *CyPA* 基因结构包括 8 个 β -折叠和 2 个 α -螺旋。家蚕 CyP 家族基因蛋白质一级结构变化较显著,与人 *CyPA* 基因的一致性由 34% 到 73% ,位于 β -VIII 折叠周围的疏水区域是催化活性位点的保守结构域,与人 CyPA 相应的 PPIase 活性位点及 CsA 结合位点氨基酸分别是 Arg-55 ,Phe-60 ,His-126 和 Trp-121 (图 6)。图 7 所示为图 6 中分析的蛋白质序列的系统进化树,从系统发育树中可以看出家蚕 *CyPA* 与

人及果蝇 *CyPA* 聚在一起。位于系统发育树下方包含 7 个家蚕 *CyP* 基因,均定位在细胞质。除 Bmb013089 外其余基因在 α -I 和 β -III 之间都含有一段共同的保守区域,即 Glu/Pro-43 与 Tyr-56 之间的区域,且除 Bmb012146、Bmb039919 外这一区域均由 3 个氨基酸组成。对这一区域高度保守性的研究表明该区域在较古老的真核生物中已经存在,后来由于发生序列删除呈现出多样性(Chou *et al.* ,1997)。7 个基因中大多数都包含 CsA 结合位点以及 PPIase 活性位点,表明它们可能具有催化活性。位于系统发育树上方的 *CyP* 基因可能在序列的区分上更加细微,大多数基因缺失了位于在 α -I / β -III 之间的连接片段,而 Bmb002301、Bmb014624 在 β -IV / β -V 区域间出现插入序列。这部分基因多数缺失了 CsA 结合位点。

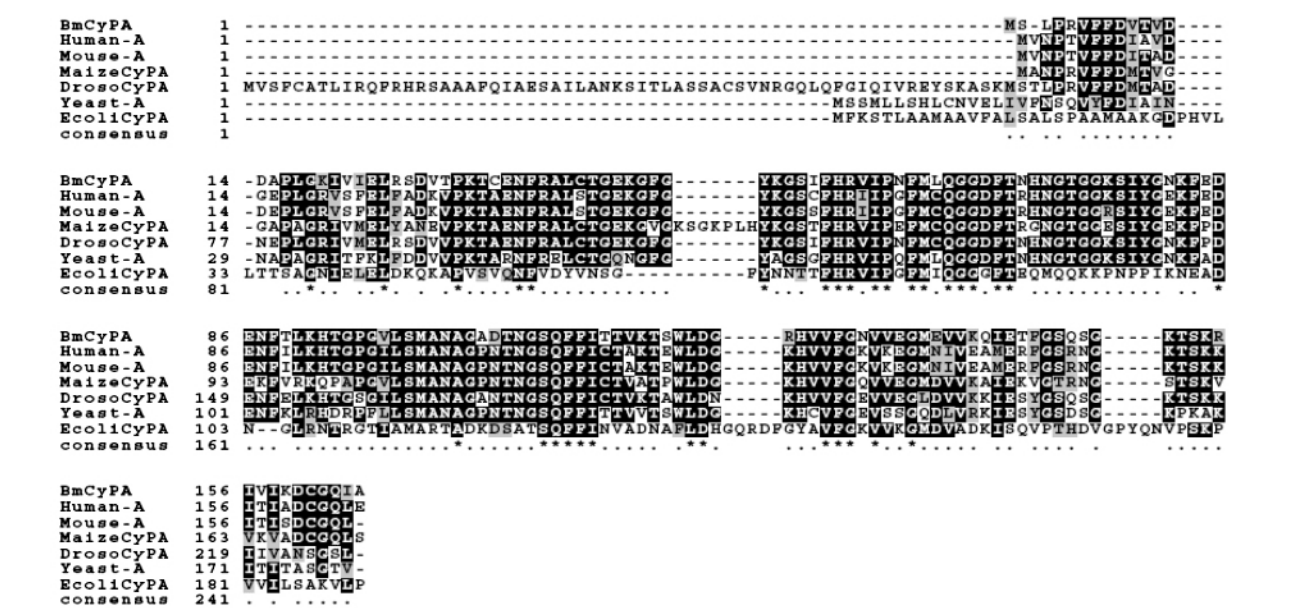


图 3 家蚕 BmCyPA 基因与其同源性基因比对分析

Fig. 3 Alignment of CyPA sequence of *Bombyx mori* and its homologous genes of other species

Human-A：人类 *Homo sapiens*，GenBank accession no. P62937；Mouse-A：小鼠 *Mus musculus*，GenBank accession no. P17742；

MaizeCypA：玉米 *Zea mays*，GenBank accession no. AAA63403；DrosoCyPA：果蝇 *Drosophila melanogaster*，GenBank accession no. P25007；

st-A：酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，GenBank accession no. P14832；EcoliCyPA：大肠杆菌 *Escherichia coli*，GenBank accession no. NP_289911.

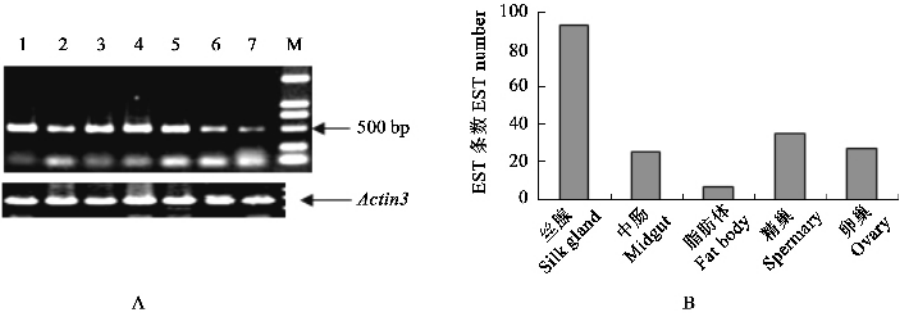


图 4 家蚕 BmCyPA 基因的组织表达分析

Fig. 4 *BmCyPA* expression in different tissues of *Bombyx mori*

A 家蚕 *BmCyPA* 基因的组织表达分析 The analysis of silkworm *BmCyPA* expressed in different tissues. 1：丝腺 Silk gland；2：中肠 Midgut；3：头部 Head；4：精巢 Spermary；5：表皮 Epidermis；6：卵巢 Ovary；7：脂肪体 Fat body；M：DL2000 分子量标准 DL2000 Marker.

B. 五组织中 *BmCyPA* 基因 EST 条数 Total number of *BmCyPA* ESTs in five tissues.

3 讨论

本研究克隆得到了家蚕 *BmCyPA* 基因,其核心功能域包括第 3 – 164 位氨基酸序列。在家蚕 *BmCyPA* 中, Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Gly72, Ala101, Asn102, Ala103, Gln111, Phe113, Trp121, Leu122 和 His126 与人 CyP 功能氨基酸类似(图 3)。人 CyPA 包括 8 个 β -折叠和 2 个 α -螺旋。突变研究表明 Trp-121 为 CsA 结合必需氨基酸,但不是 PPIase 活性必需氨基酸;PPIase 活性位点 Arg, Phe, His 的

突变导致异构酶活性低于 1% (Zydowsky *et al.*, 1992)。推测家蚕 *BmCyPA* 的 Trp121 色氨酸残基同样具有与 CsA 结合的特性,而 Arg55, Phe60 和 His126 则与 PPIase 活性相关。5 龄蚕后部丝腺旺盛地合成 RNA 和 DNA,丝蛋白大量表达。*BmCyPA* 具有的 PPI 活性可能在丝蛋白合成后转变为活性构象的过程中发挥重要作用。CyPA 具有分子伴侣功能,可帮助蛋白向正确的折叠方向进行,提高蛋白质的合成效率。EST 数据和组织表达谱结果表明 *BmCyPA* 基因在 5 龄蚕后部丝腺高丰度表达,提示我们 *BmCyPA* 的大量表达可能与丝蛋白的正确折叠有关。但是, CsA

表 1 家蚕 *Cyclophilin* 基因家族
Table 1 *Cyclophilin* gene family of *Bombyx mori*

基因名称 Gene	基因编号 Gene ID	分子量 kD/aa	EST 条数 ESTs	Subcellular Location/Target P ¹	Aligned ²	RFWH/PPIase ³ % Identity ⁴
Single domain cyclophilins						
BmCyPA	Bm010862	18.2/165	49	Cytosol	1 – 165	RFWH/- 73
BmCyPB	Bm033292	22.1/200	1	ER	26 – 186	RFNH/- 56
Bmb013089	Bmb013089	11.5/105	1	Cytosol	1 – 115	WH/- 73
Bmb031348	Bmb031348	23.9/213	0	Mitochondria	38 – 199	RFWH/- 43
Bmb012146	Bmb012146	15.8/140	0	Cytosol	18 – 140	RFSL/- 59
Bmb039919	Bmb039919	11.2/100	0	Cytosol	13 – 100	RF/- 59
Bmb011014	Bmb011014	18.1/161	0	Nucleus	1 – 161	RFPY/- 43
Bmb040741	Bmb040741	21.3/191	0	Nucleus	14 – 162	RFPH/- 44
Bmb002301	Bmb002301	11.7/106	2	Nucleus	1 – 106	QH/- 64
Bmb034486	Bmb034486	16.3/148	0	Nucleus	1 – 117	SFHN/- 44
Bmb024377	Bmb024377	21.3/203	0	Nucleus	105 – 203	RF/- 51
Bmb022236	Bmb022236	10.4/91	0	Cytosol	1 – 91	RF/- 49
BmCyPE	DQ311261	34.8/306	1	Nucleus	118 – 282	RLQH/- 39
ABD36193	DQ311248	21.4/197	1	Cytosol	37 – 197	RFWH/- 73
Multidomain cyclophilins						
Bmb014624	Bmb014624	55.9/487	1	Nucleus	1 – 129	SFDH/- 37
Bmb013088	Bmb013088	23.6/206	0	Cytosol	145 – 206	SS/- 64
Bmb022610	Bmb022610	43.1/384	1	Cytosol	228 – 384	KLQH/- 36
Bmb022911	Bmb022911	50.6/459	0	Cytosol	297 – 458	QEGT/- 34

¹ 用 PredictNLS(<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>) 程序预测的基因亚细胞定位 Subcellular location using PredictNLS (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>); ² 用于分析的序列长度 Length of analyzed sequence ; ³ PPIase 活性位点及 CsA 结合位点(Arg , Phe , Trp , His) Amino acid present at positions required for PPIase activity and CsA binding site(Arg , Phe , Trp , His); ⁴ 与人 CyP 相比较的序列一致性数值 Identity values are compared to human CyP A.

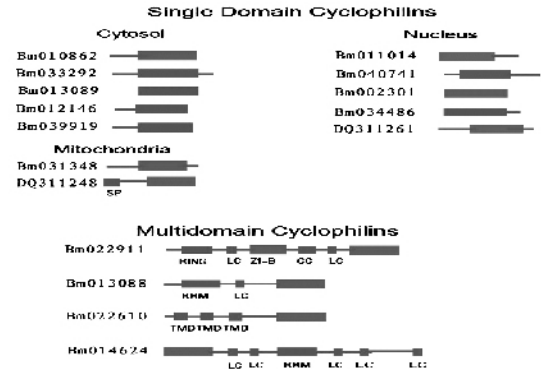


图 5 家蚕 CyP 家族蛋白质 SD 和 MD 结构

Fig. 5 SD and MD structure of *Bombyx mori* CyPs
SP: 信号肽 Signal peptide; RING: RING 指 RING-finger; LC: 低复杂度结构域 Low complexity; ZF-B: B-Box 锌指 B-box zinc finger; CC: 卷曲螺旋 Coiled coil; RRM: RNA 识别基序 RNA recognition motif; TMD: 跨膜结构域 Transmembrane domain.

是否参与了家蚕 BmCyPA 活性调控还需要进一步的实验验证。

结构域分析显示家蚕 CyP 基因家族可分为 SD 和 MD 两类。家蚕具有大量位于细胞质的 SD BmCyP, 由于它们之间的氨基酸序列相似性很高, 因此区别它们的功能差异较为困难。真核生物 CyP 基因有多种亚型, 对拟南芥的研究发现 CyPs 不同亚型在各个组织都有表达, 参与细胞分化和个体发育

过程(Chou and Gasser, 1997)。BmCyPA(Bm010862) 的组织表达谱分析表明在家蚕多个组织都检测到了 BmCyPA 的表达, 提示我们该基因可能作为看家基因在蛋白质折叠加工过程中起作用; 它在丝腺呈高表达, 其 PPIase 活性可能与 5 龄蚕后部丝腺中发生旺盛的丝蛋白合成和加工相关。

CyP_RRM 具有 MD 结构, 是 CyPs 的一个亚家族, 包括了大部分具有 RRM 区域的真核生物 CyP 基因, 如: 人 hCyP-57, 拟蓝芥 AtCYP59, 线虫 CeCyP-44, 草履虫 Kin241。其中草履虫 Kin241 在细胞形态发生上具有重要作用(Krzywicka et al., 2001)。在拟蓝芥中发现了约 200 个包括 RRM 域的基因, 在动物、真菌和蓝细菌中也都发现了包含 RRM 域的基因(Romano et al., 2004)。家蚕 CyP 家族基因 Bmb013088 和 Bmb014624 具有 RRM 域, 推测这两个基因的表达产物在蛋白质转录后加工过程中起作用, 通过调节与不同 RNA(包括 mRNA 前体、mRNA、rRNA 前体、cpRNA 和小核酸 RNA) 的结合, 实现看家基因功能及调控机制。CyP_RING 类型基因具有 RING 指修饰的功能域, 具有这种结构的基因有人 hCyP-60 和线虫 MOG-6。人 hCyP-60 与蛋白酶抑制多肽 eglin-c 相互作用, 线虫 MOG-6 与一种核锌指蛋

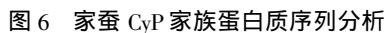


Fig. 6 Alignments of CyP protein sequences of *Bombyx mori*

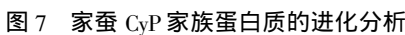


Fig. 7 Phylogenetic analysis of CyP proteins of *Bombyx mori*

本文首次报道了家蚕 *BmCyPA* 基因的克隆,并对不同组织中 *BmCyPA* 基因的表达情况进行了研究。同时我们还对家蚕 *CyPB* 基因的表达谱情况进行了分析, *BmCyPB* 基因在家蚕中肠、脂肪体表达量

较高,而在其他组织不表达(数据未列出)。通过分析 CyP 家族蛋白质与其他相关蛋白质的相似部分预测了 *BmCyP* 基因的功能。我们的结果对于进一步研究 *BmCyPA* 基因功能及分析这一复杂而重要的蛋白质家族的生理学角色和阐明分子机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- Barik S, 2006. Immunophilins : for the love of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* , 63(24) : 2 889 – 2 900.
- Bayer E, Goettsch S, Mueller JW, Griewel B, Guiberman E, Mayr LM
Bayer P, 2003. Structural analysis of the mitotic regulator *hPin1* in solution : insights into domain architecture and substrate binding. *J. Biol. Chem.* , 278 (28) : 26 183 – 26 193.
- Boulos S, Meloni BP, Arthur PG, Majda B, Bojarski C, Knuckey NW, 2007. Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against *in vitro* oxidative and ischemic injury. *Neurobiol. Dis.* , 25(1) : 54 – 64.
- Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, Kim JH, Ha J, Choe W, Kim SS, 2007. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res.* , 67(8) : 3 654

- 3 662.
- Chou IT , Gasser CS , 1997. Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol. Biol.* , 35(6): 873 – 892.
- Gething MJ , Sambrook J , 1992. Protein folding in the cell. *Nature* , 355 (6 355): 33 – 45.
- Handschumacher RE , Harding MW , Rice J , Drugge RJ , Speicher DW , 1984. Cyclophilin : a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* , 226(4 674): 544 – 546.
- Krzywicka A , Beisson J , Keller AM , Cohen J , Jerka-Dziadosz M , Klotz C , 2001. KIN241 : a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol. Microbiol.* , 42(1): 257 – 267.
- Lodish HF , Kong N , 1991. Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* , 266 (23): 14 835 – 14 838.
- Romano PG , Horton P , Gray JE , 2004. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant Physiology* , 134(4): 1 268 – 1 282.
- Wang P , Heitman J , 2005. The cyclophilins. *Genome Biol.* , 6(7): 226.
- Xia QY , Zhou ZY , Lu C , *et al.* , 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* , 306(5 703): 1 937 – 1 940.
- Zheng HW , You H , Zhou XZ , Murray SA , Uchida T , Wulf G , Gu L , Tang XR , Lu KP , Xiao Z , 2002. The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* , 419(6 909): 849 – 853.
- Zydowsky LD , Etzkorn FA , Chang HY , Ferguson SB , Stolz LA , Ho SI , Walsh CT , 1992. Active site mutants of human cyclophilin-A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin-A binding and calcineurin inhibition. *Protein Science* , 1(9): 1 092 – 1 099.
- (责任编辑 : 黄玲巧)